

Biochemische Untersuchungen über die Laktoseformen der Muttermilch

von

ERNST FRITZ

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Biochemische Untersuchungen über die Laktoseformen
der Muttermilch

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ernst Fritz

aus

München

1959



5349/60

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Referent: Professor Dr. K. Stuhlfauth

Dekan: Professor Dr. H. Schwiegk

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1959

M e i n e r M u t t e r

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	5
Themastellung	14
Experimenteller Teil	14
Ergebnisse	22
Literaturverzeichnis	24

E i n l e i t u n g

Es ist eine unumstößliche Tatsache, daß die Frauenmilch die einzige physiologisch allen Ansprüchen genügende Nahrung des menschlichen Säuglings ist. Doch hat auch die sog. künstliche Ernährung in zunehmendem Maße Resultate erzielt, welche nicht mehr allzuweit hinter den Erfolgen des Stillens zurückstehen.

Trotzdem sind Unterschiede zwischen Brust- und Flaschenkindern nicht zu übersehen. G y ö r g y ¹ brachte 1955 auf Grund weitgehender Versuche und Beobachtungen die folgende Tabelle heraus, in der Ernährung, Mortalität und Morbidität in Beziehung gesetzt sind.

Ernährung	Zahl d. Säugl.	Mortal. pro 1000	Morbid. pro 1000	Fall- Mortal. (%)
Brusternährt	971	10,2	223,4	4,6
Teil-Flaschenernährt	1441	25,7	464,2	5,5
Flaschenernährt	854	57,3	573,7	10,0
Insgesamt	3266	29,3	421,3	6,9

Leider ist hier nicht erläutert, welcher Art die "Flaschennahrung" war. Zeifellos bestehen in der Qualität solcher Nahrungen oft erhebliche Unterschiede, so daß man die hier geschilderten Ergebnisse sicher nicht generalisieren kann.

Unterschiede findet man aber auch in den pH-Werten der Stühle und vor allem im mikroskopischen Stuhlbild. Frauenmilch erzeugt in großer Reinheit und mit konstanter Regelmäßigkeit Bifidus-

flora. Man sieht in ihr den Garanten für ein gutes Gedeihen des Säuglings. Was lag deshalb näher als das Bestreben zahlreicher Autoren, diese für den Säugling physiologische Bifidusflora auch bei der Verfütterung künstlicher Nahrungsgemische auf Kuhmilchbasis zu erhalten, beobachtete man doch, daß beim Umstellen auf Flaschennahrung die Bifidusflora durch eine sog. Mischflora zurückgedrängt wurde.

Seit der Entdeckung des *Bacterium bifidum* durch T i s s i e r ² ist man deshalb nicht müde geworden, dem bifidogenen Prinzip der Frauenmilch nachzugehen und es, wenn möglich, auf die sog. künstlichen Nahrungsgemische zu übertragen. Erwähnt seien hier die Forschungen von B e s s a u ³, A d a m ⁴, M a l y o t h ⁵, M a y e r ⁶ u.a.

Auch rein analytisch zeigen sich zwischen Frauen- und Kuhmilch signifikante Unterschiede. Die folgende Tabelle von L u s t , P f a u n d l e r und H u s l e r ⁷ möge das unterstreichen. Nach ihr sind in 100 ccm enthalten:

	Eiweiß in g	Fett in g	Zucker in g	Salze in g
Frauenmilch	1,2-1,5	3,5-4,0	6-7	0,25
Kuhmilch	3,5-3,7	3,5-4,0	4-5	0,75

Besonders deutlich sind die Unterschiede im Eiweiß- und Kohlehydratgehalt sowie bezüglich der Mineralstoffe. Damit aber nicht genug. Neben diesen bei grob-chemischer Betrachtung rein quantitativen Differenzen sind es auch Unterschiede in der Zusammensetzung der einzelnen Hauptkomponenten. Nach W i l l i a m s o n ⁸ setzen sich die 1,5% Eiweiß der Frauenmilch aus ca. 1% Albumin und 0,5% Kasein zusammen, während bei der Kuhmilch von insgesamt

3,5% Eiweiß nur etwa 1/7 auf Albumin, der erheblich überwiegende Rest aber auf Kasein entfällt.

Über den unterschiedlichen Gehalt an Mineralstoffen möge folgende Tabelle Auskunft geben:

Mineralgehalt in mg%		
	Frauenmilch	Kuhmilch
Natrium	17	32
Kalium	51	143
Mangan	4	10
Calcium	34	106
Chlor	38	120
Gesamt-P	14	94
Gesamt-S	14	26

Schon diese Zahlen und Angaben zeigen, daß es sicher eine Utopie ist zu glauben, mit einer grob-chemischen Angleichung der Kuhmilch an die Muttermilch auch deren optimale Erfolge zu erreichen. Eine so behandelte Kuhmilch bleibt trotzdem eine Rindermilch, also die "Muttermilch für das Kalb". Die Frage der Art-spezifität für den menschlichen Säugling ist damit nicht gelöst.

Das Problem einer künstlichen Ernährung kann also wohl nur befriedigend gelöst werden, wenn man sich als Ziel setzt, der optimalen Wirkung der Muttermilch nahezukommen, d.h., die Nahrung ähnlich gut verträglich zu machen und auch ein möglichst adäquates Darmmilieu zu schaffen.

Schon frühzeitig wandte man sich zur Erklärung der unterschiedlichen Wirksamkeit von Frauen- und Flaschenmilch den Abweichungen im Kohlehydratgehalt beider Nahrungen zu. Dabei setzte man

die Verträglichkeit in Parallele zur Ausbildung einer Bifidusflora. Als erster hat wohl S i t t l e r ⁹ (1908) mittels diätetischer Maßnahmen den Versuch unternommen, auch beim künstlich ernährten Säugling eine Bifidusflora zu erzielen. Er setzte der Kuhmilch eine 5%ige Milchzuckerlösung zu und erhielt tatsächlich bei einigen Kindern vorübergehend reine Bifidusflora.

Es würde den Rahmen des Themas sprengen, wollte man hier chronologisch alle Bestrebungen anführen, die in der Folgezeit von zahlreichen Autoren (u.a. besonders A d a m ⁴ und B e s s a u ³) unternommen wurden, um auch mit Flaschennahrungen die erwünschte bifidogene Wirkung zu erzielen. Dabei widmete man dem Milchzucker erhöhte Aufmerksamkeit. M a l y o t h ⁵ z.B. vertrat die Meinung, daß die Beta-Form des Milchzuckers, abgestimmt auf die anderen Nährstoffe der Nahrung, verantwortlich für das Auftreten einer Bifidusflora sei. Mit Alpha-Lactose konnte er diese Ergebnisse in vivo nicht erzielen.

P e t u e l y ¹⁰ brachte 1948 den Begriff des "Bifidus-Faktors". Er glaubte, ihn in der Frauenmilch gefunden zu haben und kündigte dessen Isolierung an. Einer künstlichen Nahrung zugesetzt, soll dieser Faktor in der Lage sein, Bifidusflora zu erzeugen. Chemisch handelt es sich um Lactulose, ein Keton-Isomeres der Lactose.

G y ö r g y und Mitarbeiter ¹¹ fanden 1953 in der Frauenmilch einen für das Wachstum einer Mutante von Bifidus notwendigen Faktor. Sie machten dabei aber die Einschränkung, daß dieser Faktor nur in vitro, nicht also in vivo, wirksam sei.

Nach Untersuchungen einer französischen Forschergruppe ¹² soll Bifidusfaktor auch in Peptiden vorhanden sein, die aus Aspergillus-oryzae-Amylasen stammen, wie sie bei der Herstellung eines Nährzuckers Verwendung finden. Mit der Verfütterung dieses Nährzuckers gelangen sie in den Säuglingsorganismus und entwickeln dort ihre bifidogene Wirkung.

Auch der Korrelation zwischen Milchzucker und Eiweiß in der Nah-

rung wird eine Bedeutung für das Bifidus-Wachstum beigemessen. Der Quotient Milchzucker: Eiweiß soll bei 2,6 und höher liegen, will man eine bifidogene Wirkung erzielen. Unter diesem Milchzucker-Eiweiß-Quotienten versteht man die Zahl, die angibt, wieviel Gramm Milchzucker pro 1 Gramm Eiweiß in der Nahrung enthalten sind. In der Frauenmilch liegt der Quotient bei 5, in der Kuhmilch bei 1,43. Bei verschiedenen Nahrungsgemischen wird er durch Zugabe von Lactose auf 2,6 und darüber speziell eingestellt. P e t u e l y ¹⁰ vertritt die Meinung, daß für die Entstehung einer Bifidusflora im Dickdarm des Säuglings eine bestimmte Milchzuckermenge erforderlich ist, die nur dann in den Dickdarm gelangen kann, wenn die Korrelation Lactose: Eiweiß den oben genannten Wert aufweist.

Wie bereits erwähnt, schrieb M a l y o t h ⁵ der Beta-Lactose eine bifidogene Wirkung zu. Er fand, daß die optimale Drehung von Frauenmilch geringer ist als die von Kuhmilch und nahm daher an, daß in der Frauenmilch bevorzugt Beta- und in der Kuhmilch bevorzugt Alpha-Lactose vorhanden sei. H i r a t a ¹³ konnte 1958 die Messungen von M a l y o t h bestätigen und fand die spezifische Drehung von Frauenmilch mit $43,5^{\circ}$ gegenüber der Kuhmilch mit $55,5^{\circ}$ erheblich geringer. Da in beiden Milchen fast ausschließlich Laktose als optisch aktive Substanz in Frage kommt, diskutiert auch er, ob durch einen besonderen Faktor das Gleichgewicht der Lactose in der Frauenmilch zugunsten der Beta-Form verschoben sei. Er neigt aber noch eher zu einer dritten Erklärungsmöglichkeit und macht die Existenz besonderer linksdrehender Substanzen für die Verminderung der spezifischen Rotation verantwortlich.

Trotz des sterischen Unterschiedes zwischen Alpha- und Beta-Lactose ist es schwierig, biochemische unterschiedliche Wirkungen beider Lactose-Formen festzustellen, bilden doch beide Zucker in Lösung rasch ein Gleichgewicht. Auch M a l y o t h war sich anfangs (1939) auf Grund dieser Überlegungen nicht sicher, ob man es bei der Verfütterung nur des einen Isomers an der Stelle der endgültigen Resorption im Darm wirklich noch

vorwiegend mit dieser einen Substanz zu tun hat, oder ob sich durch die mehr oder minder rasch ablaufende Mutarotation inzwischen das natürliche Gleichgewicht von 36,9% Alpha-Lactose und 63,1% Beta-Lactose eingestellt hat. Er nahm seine Messungen damals in 5%iger wäßriger Lösung bei Zimmertemperatur vor und stellte fest, daß die anfangs rasch dem Gleichgewicht zustrebende Mutarotation doch ca. 2 Stunden brauchte, um das Verteilungsgleichgewicht zu 80% zu erreichen. Nach späteren (1947) sehr diffizilen Messungen der Rotation gab er an, daß "Die Gleichgewichte zwischen der Alpha- und Beta-Form in der Kuhmilch zugunsten der Alpha-Form, das Gleichgewicht der beiden Lactoseformen in der Frauenmilch zugunsten der Beta-Form verschoben sei" ¹⁴. Auch S a v e l s b e r g ¹⁵ fand im Lactosegleichgewicht zwischen Frauen- und Kuhmilch Unterschiede. Erst von H i r a t a ¹³ wurde vor einem Jahr in vivo das Tempo der Mutarotation im Säuglingsmagen gemessen. Alpha-Lactose benötigt 60 Minuten, Beta-Lactose 50-70 Minuten bis zur Einstellung des Gleichgewichtes. Da nach seinen eigenen Angaben Muttermilch schon nach 30-50 Minuten oder Säuglingsnahrung mit 7% Lactose schon nach 45-60 Minuten in der Ileocoecalregion ankommt, dürfte die Mutarotation bei Gaben von nur einer Lactoseform bis dahin kaum völlig abgelaufen sein, wie man nach den Messungen in vitro bei 37° annehmen wollte. Weiterhin konnte H i r a t a ¹³ mit Hilfe seiner Spezialsonden, mit denen er Darminhalt aus der Ileocoecalgegend und aus dem oberen Colon entnahm, nachweisen, daß der Lactosegehalt dort bei etwa 2,3% liegt. Nach seinen Experimenten genügen dort aber schon 1,2% Lactose, um eine Bifidusflora von 50% und mehr zu erzeugen.

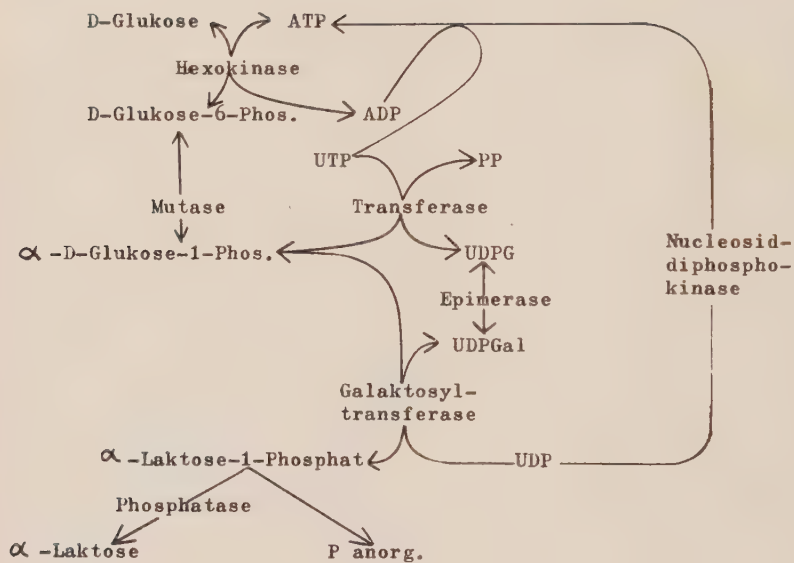
Angaben über verschiedene Spaltungsgeschwindigkeiten der Lactose sind in der Arbeit von H i r a t a ¹³ nicht gemacht. Mit diesem Problem befaßte sich P a f f r a t h ¹⁶ bereits 1929. Er prüfte, ob die Spaltungsgeschwindigkeit des Milchzuckers unter Einwirkung von Kalbslactase durch verschiedene Manipulationen verändert werden kann. Aber weder Aufkochen der Milch noch Vereisen ergaben Geschwindigkeitsdifferenzen. Auch bei Frauenmilch, deren Lactose abdialysiert und durch technischen Milchzucker (Alpha-Lactose) ersetzt war, fanden sich keine Unterschiede. Resorptionsdifferen-

zen zwischen den beiden Milchzuckerformen im Kaninchendünndarm hatte P a f f r a t h ¹⁶ ebenfalls nicht gefunden. Bei seiner Versuchsanordnung verweilte der Milchzucker über eine Stunde in einem abgeschnürten Dünndarmstück. Danach dürfte die Mutarotation bereits beendet gewesen sein, so daß in beiden Fällen nur Gleichgewichtslactose den Darmenzymen zur Spaltung und anschließenden Resorption angeboten wurde.

S o m m e r f e l d ¹⁷ untersuchte 1935 das Ultrafiltrat aus frischer Frauenmilch und fand nach 1 - 1 1/2 Stunden keine Drehungsänderung mehr. Auch Spaltungsversuche, die er mit Säuglings- und Kalbslactase an Alpha- und Beta-Lactose vornahm, ergaben keine bevorzugte Spaltung einer der beiden Formen. Der Autor schloß daraus, daß der Milchzucker in der Frauenmilch in keiner besonderen biologischen Form vorhanden sei und mit dem in Wasser gelösten Handelsmilchzucker in Bezug auf das Verhältnis Alpha zu Beta identisch sei. Es ist jedoch anzunehmen, daß bei der langen Dauer seiner Versuche (die Spaltungsgeschwindigkeit wurde indirekt an der Gärung der bei der Spaltung entstandenen Glukose gemessen) die Mutarotation bereits beendet war, so daß er immer nur die aus der Invertierung der Gleichgewichtslactose entstehende Glucose gemessen haben dürfte.

Bis vor kurzem herrschte über die Bildung von Lactose noch große Unklarheit. Man nahm früher für ihre Entstehung die Umkehrung der Lactasereaktion an, was allerdings nicht bestätigt werden konnte. Die erste Biosynthese gelang G r a n t ¹⁸ mit Hilfe von Milchdrüsenschnitten. Dabei konnte er feststellen, daß angebotene Galaktose, Mannose und Fruktose kaum bei der Synthese der Lactose verwendet werden, sondern daß sich am besten Glukose eignet. Erfolgreich waren auch Versuche von K n o c h t und P e t e r s e n ¹⁹ mit Milchdrüsenschnitten der Kuh und als Kohlehydratquelle Maltose, Glykogen und Glukose.

Heute kann die Synthese der Lactose nach folgendem Schema angegeben werden:



Erklärung der Abkürzungen:

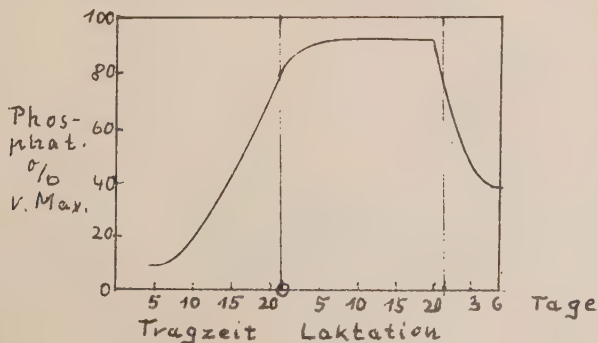
ATP	= Adenosintriphosphat
ADP	= Adenosindiphosphat
UTP	= Urinditriphosphat
UDP	= Uridindiphosphat
UDPG	= Uridindiphosphoglukose
UDPGal	= Uridindiphosphogalaktose
PP	= Pyrophosphat

Die Phosphorylierung der D-Glukose zu D-Glukose-6-Phosphat wird bei Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) durch das Enzym Hexokinase bewirkt. T r e n e r ²⁰ und K i t t i n g e r ²¹ berichten über Hexokinaseaktivität in laktierenden Drüsen. R e i t h e l ²² konnte zeigen, daß für die Laktosesynthese ATP erforderlich ist.

Die Umwandlung von D-Glukose-6-Phosphat in α -D-Glukose-1-Phosphat wird durch das Enzym Phosphoglukomutase bei Anwesenheit von Glukose-1,6-diphosphat bewirkt. K i t t i n g e r ²¹ und R e i t h e l ²² konnten dieses Enzym in der Milchdrüse nachweisen, ebenso wurde es noch von G a n d e r ²³ und anderen gefunden. Ein weiteres Enzym, die Pyrophosphaturidyltransferase katalysiert die Bildung von Uridindiphosphoglukose aus Uridintriphosphat und α -D-Glukose-1-Phosphat. Im Mammagewebe von laktierenden Ratten konnten S m i t h und M i l l s ²⁴ und M a x w e l l und Mitarbeiter ²⁵ dieses Enzym nachweisen.

Die Umwandlung von Uridindiphosphoglukose in Uridindiphosphogalaktose katalysiert das Enzym Uridindiphosphogalaktose-4-Epimerase. Galaktosyltransferase konnten G a n d e r und Mitarbeiter ²⁶ aus Eutern laktierender Kühe anreichern. Das Enzym bildet aus α -D-Glukose-1-Phosphat und Uridindiphosphoglaktose α -Laktose-1-Phosphat unter gleichzeitiger Freisetzung von Uridindiphosphat.

Der Phosphatrest der α -Laktose-1-Phosphorsäure wird durch alkalische Phosphatase abgespalten und man erhält Laktose. Der Phosphatasegehalt der Milchdrüse steigt während der Tragzeit an und bleibt über die ganze Laktationsperiode hinweg auf einem 12-fachen Wert stehen, wie die folgende schematische Darstellung zeigt:



Die Rückbildung von Uridintriphosphat erfolgt durch Phosphorylierung von Uridindiphosphat mit Nucleosiddiphosphokinase und Adenosintriphosphat. Wie aus dem beschriebenen synthetischen Vorgang klar ersichtlich ist, entsteht α -Lactose.

Themastellung

In vorliegender Arbeit sollte nun mit modernen Untersuchungsmethoden geprüft werden, ob in der Frauenmilch überwiegend Alpha- oder Beta-Lactose vorhanden ist bzw. ob das Gleichgewicht zugunsten einer dieser beiden Formen verschoben ist. Ferner war zu prüfen, ob eventuell eine der beiden Formen durch eine Bindung an Proteine stabilisiert ist. In weiterer Verfolgung dieser Überlegungen sollte die Wirkung des Ferments Laktase auf die beiden Laktoseformen untersucht werden.

Außerdem sollte festgestellt werden, ob unter gewissen Umständen eine Verzögerung der Gleichgewichtseinstellung vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurde die Mutarotation der Laktose in verdünntem Duodenalsaft gemessen.

Experimenteller Teil

1. Beobachtungen über die Mutarotation von Alpha- und Beta-Lactose im Duodenal- und Magensaft.

Nach Angaben M a l y o t h s soll die Beta-Lactose von Säuglingen gut toleriert werden und das Wachstum des Lactobacillus bifidus fördern. Es galt nun nachzuweisen, ob diese beiden Kriterien tatsächlich der Beta-Lactose zuzuschreiben sind. Daher mußte zunächst festgestellt werden, ob die entsprechende Form der Lactose in die Spalt- und Resorptionsregionen des Darmes vordringt und ob dem Lactobacillus bifidus überhaupt noch reine Beta-Lactose zur Verfügung steht. Wir untersuchten deshalb, ob eine Verzögerung bzw. Blockierung der Gleichgewichtseinstellung durch Duodenal- oder Magensaft eintritt. Da eine Messung der in unverdünntem

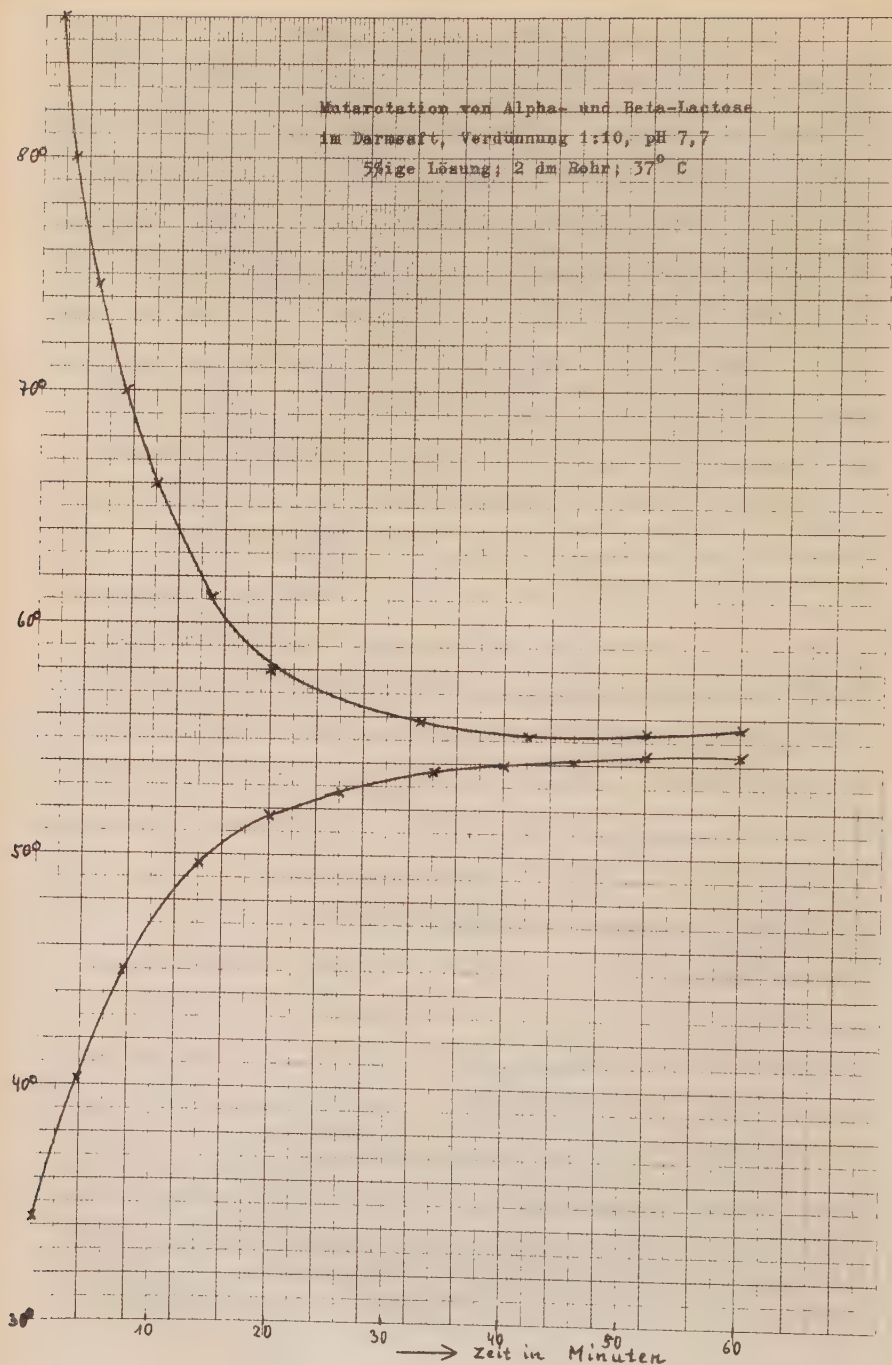
Duodenalsaft gelösten Lactose wegen der Eigenfarbe des Saftes nicht möglich war, wurde der Duodenalsaft mit destilliertem Wasser auf das Zehnfache verdünnt. Diese Lösung wurde im Thermostaten auf 37°C gebracht. Mit diesem vorgewärmten, verdünnten Duodenalsaft wurde eine 10%ige Laktoselösung (Alpha oder Beta) hergestellt. Sofort nach dem Lösen einer der beiden Milchzuckerisomeren wurde in einem temperaturkonstanten 2 Dezimeter-Rohr der Drehwert bei 37°C gemessen. Wir verfolgten dabei die Änderung des Drehwertes über 2 Stunden. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit der Glaselektrode gemessen. Als Vergleichswerte dienten Laktoselösungen, die an Stelle des Duodenalsaftes eine verdünnte Pufferlösung mit gleichem pH-Wert enthielten. Eine Verzögerung bzw. Blockierung der Gleichgewichtseinstellung durch Duodenalsaft konnten wir gegenüber den Werten mit der Pufferlösung nicht beobachten (vergl. Kurve 1).

Mit Magensaft stellten wir die gleichen Versuche an und sahen auch hier keine Verzögerung oder Blockierung des Gleichgewichts (Kurve 2).

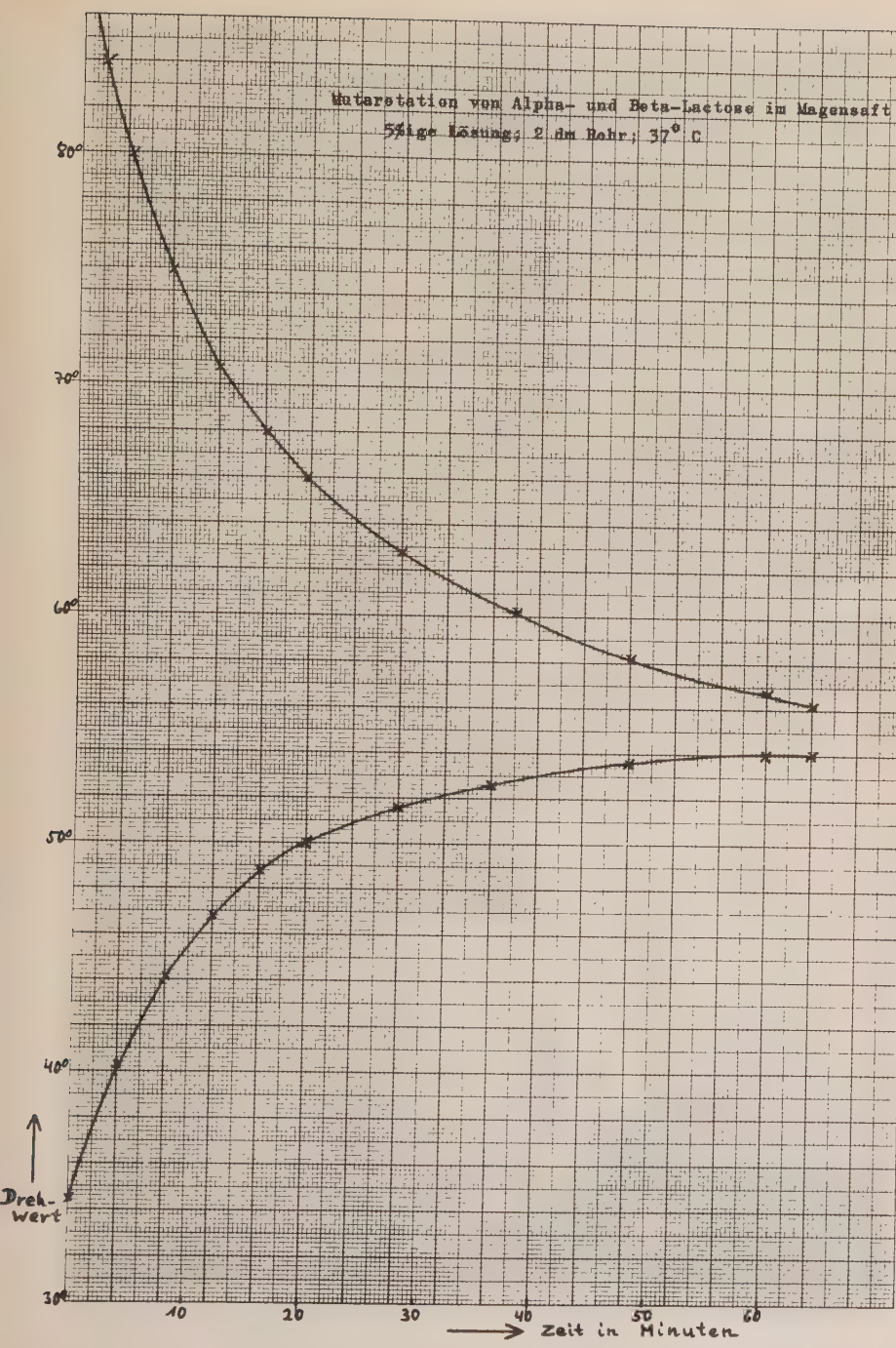
2. Untersuchungen über die Gleichgewichtseinstellung des Milchzuckers in Frauenmilchfiltraten.

Um nachzuweisen, welche der Lactoseformen (Alpha oder Beta) in der Frauenmilch vorkommt, wurde frisch abgepumpte Frauenmilch in einem Aceton-Trockeneisbad eingefroren. Von der Entnahme bis zum Einfrieren verstrichen höchstens 5 Minuten. Es ist anzunehmen, daß in dieser kurzen Zeit die Mutarotation kaum fortschreitet. Zur Vorbereitung der Messung wurde die Milch aufgetaut und im Eisschrank durch einen Seitz EK-Filter unter Saugen abfiltriert. Dabei wurde das abtropfende Filtrat in einem tiefgekühlten Gefäß erneut eingefroren. Durch diese Manipulation wurde die Mutarotation sehr stark verlangsamt, wie Kurve 3 veranschaulicht. Nun wurde das Filtrat aufgetaut. In einem 1 Dezimeter-Rohr wurde im Zeiss-Winkel-Polarimeter der Drehwert gemessen. Es war hierbei niemals eine Änderung der Anfangsdrehung zu beobachten.

Matarotation von Alpha- und Beta-Lactase
im Darmsaft, Verdünnung 1:10, pH 7,7
5%ige Lösung; 2 dm Rohr; 37° C

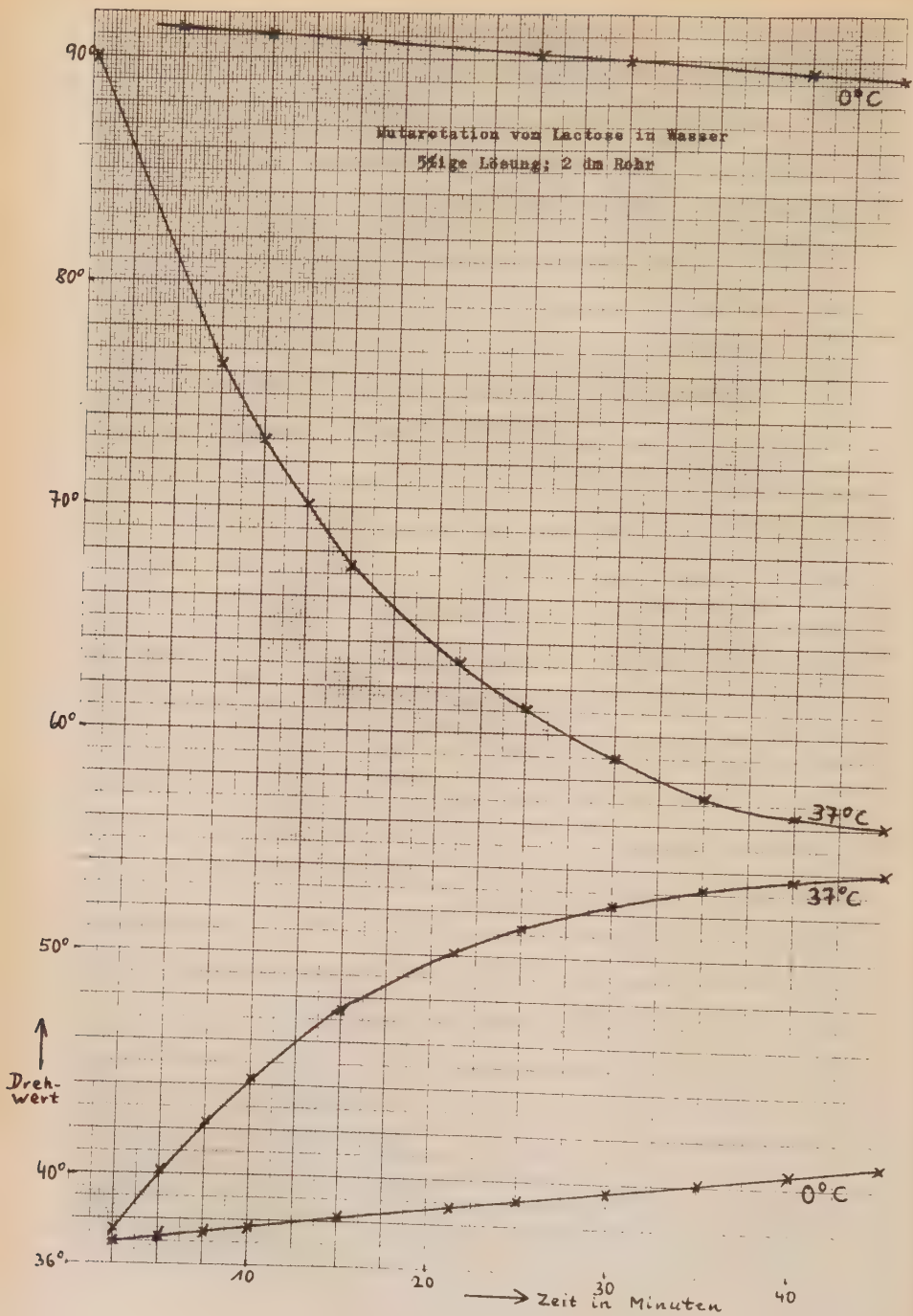


Hydrotation von Alpha- und Beta-Lactose im Magensaft
5%ige Lösung; 2 dm Rohr; 37° C



Mutarotation von Lactose in Wasser

5%ige Lösung; 2 dm Rohr



Um die Frage einer Bindung und damit einer Stabilisierung einer der beiden Lactosekomponenten an Proteine zu prüfen, wurde zu dem aufgetauten, wie oben erhaltenen Filtrat, bei 0°C 60%ige Perchlorsäure bis zu einer Endkonzentration von 3% zugegeben. Vom denaturierten Eiweiß wurde in der Kälte bei 0°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Drehwert des klaren Überstandes, in dem sich die Lactose befindet, wie oben gemessen. Auch hierbei konnten wir keine Änderung des Anfangsdrehwertes feststellen. Eine Bindung und dadurch Stabilisierung einer der Lactoseformen an Proteine ist also unwahrscheinlich. Das läßt vermuten, daß sich der Milchzucker in der Frauenmilch bereits beim Verlassen der Mutterbrust in einem Gleichgewicht befindet.

3. Beobachtungen über die Einwirkung der Laktase auf die beiden Laktoseformen.

Es war zu prüfen, ob das Enzym Laktase eine der beiden Laktoseformen, die sich im Gleichgewicht befinden, verschieden schnell spaltet. Dafür galt es zunächst, die Laktase darzustellen. Dieses wurde nach der von Wallenfels²⁷ angegebenen Methode ausgeführt. Man benötigt dazu Kälberdärme. Im Schlachthof entnimmt man sofort nach der Schlachtung ganz junger Milchkälber, bei denen der Laktasegehalt am größten ist, den Dünndarm. Er wird unter Leitungswasser von noch anhaftenden Verdauungsresten fein säuberlich gereinigt. Dann wird die Mukosa mit einem Spatel herausgekratzt. Wir erhielten ca. 500 ml einer rötlichen, breiigen Masse. Nun werden 5 ml Toluol zugegeben und mit der Mukosa vermischt. Das Gemisch läßt man unter gelegentlichem Umrühren 3 Tage lang bei Zimmertemperatur stehen. Während dieser Zeit tritt Autolyse ein. Dann wird dem Autolysat unter Rühren Filterhilfe (Hyflo-Super-Cel) zugegeben, bis die Masse nicht mehr an der Glaswand haftet. Nach weiterer Zugabe von 600 ml Wasser rührt man noch eine halbe Stunde lang um. Dann wird die Enzymlösung am Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Dieser Vorgang dauert ungefähr 12 Stunden. Da ohne Kühlung das Ferment nicht haltbar ist, kann nur eine beschränkte Menge Filtrat gewonnen werden.

Bei unserem Versuch waren es 330 ml klares rotes Filtrat, zu dem unter Umrühren 2,3 g Na_2HPO_4 zugegeben werden. Unter weiterem, aber jetzt sehr vorsichtigem und langsamem Umrühren gibt man ganz allmählich 91 g Ammoniumsulfat zu. Die entstandene Suspension wird bei 4000 Umdrehungen/min im Eisschrank abzentrifugiert und das Sediment verworfen. Zu dem klaren roten Überstand werden nochmals 41g Ammoniumsulfat zugegeben. Der sich bildende Niederschlag wird abzentrifugiert und in Wasser aufgenommen. Wir erhielten 28 ml Lösung, die in einem Cellophan-schlauch gegen 2 Liter Phtalatpuffer 0,05 M, pH 5,0 eine Nacht lang dialysiert wird, dann noch 5 Stunden gegen 2 Liter frischen Puffer und 10 Stunden gegen 2 x 2 Liter dest. Wasser. Von dem Niederschlag, der während der Dialyse auftritt, wird abzentrifugiert. Wir erhielten schließlich 47 ml klare Enzymlösung, die lyophilisiert wird. Das Lyophilisat ist im Eisschrank unbegrenzt haltbar.

<u>Ausbeute:</u>	Filtrat	15 000 EE
	Am. Fällung	5 000 EE
	Lyophilisat	4 000 EE

Dabei bedeutet EE = Enzym-Einheit.

Nun stellten wir eine wäßrige Lösung von Alpha- bzw. Beta-Lactose her und beobachteten die Spaltung der Laktoseformen durch die Kalbslaktase, indem wir spektrophotometrisch die Spaltungsgeschwindigkeit verfolgten. Ein Unterschied zwischen Alpha- und Beta-Lactose war nicht festzustellen. Damit war aber immer noch nicht ausgeschlossen, daß eine der beiden Lactoseformen doch bevorzugt von dem Enzym Laktase angegriffen wird. Da sich bei unseren bisherigen Versuchen bei 37° C die beiden Lactoseformen bereits im Gleichgewicht befanden, die Einstellung des Gleichgewichtes jedoch bei 0° C erheblich verlangsamt wird - sie dauert bei dieser niederen Temperatur ca. 18 Stunden - wurden Versuche bei tieferer Temperatur ausgeführt. Dabei wird zwar auch die Umsatzgeschwindigkeit der Laktase verlangsamt, was jedoch durch größere Enzymmengen kompensiert wurde.

Wir stellten Laktoselösungen mit eisgekühltem Wasser her und versetzten sie mit vorgekühlter Enzym- und Pufferlösung.

Ansatz zur Laktosespaltung durch Laktase:

$1,10^{-5}$ M Alpha- bzw. Beta-Laktose,

$2,5 \times 10^{-5}$ M Laktase,

TRA-Puffer p_H 7,0 pro ml.

Versuchstemperatur 4° C.

TRA = Triäthanolamin.

Die Versuchsdauer betrug 60 Minuten, danach wurde die Enzymreaktion durch kurzes Erhitzen im Wasserbad unterbrochen, vom denaturierten Eiweiß wurde abzentrifugiert und in dem klaren Überstand die Glukose mit Hexokinase-Zwischenferment bestimmt.

Bestimmung der gebildeten Glukose

Ansatz: In eine Küvette mit der Schichtdicke 1 cm wurden folgende Substanzen einpipettiert:

0,05 ml Na_2H_2ATP 20 mg/ml, 0,2 ml 0,2 M $MgCl_2$,

0,1 ml TPN 10 mg/ml, enteiweißte Laktoselösung und

TRA-Puffer ad 3 ml.

Start: 0,05 ml ZF - HK.

Messung bei 366 nm.

Hierbei ergab sich eine deutlich bevorzugte Aufspaltung der Alpha-Laktose.

Versuchsdauer in Min.	Alpha-Laktose 10^{-5} ml	Beta-Laktose 10^{-5} ml
60	0,5	0,35

Ob sich die bei 0° C beobachtete unterschiedliche Spaltungsge-

schwindigkeit auch bei gewöhnlicher Körpertemperatur auf die Verwertbarkeit der beiden Komponenten auswirkt, ist noch offen. Sollte jedoch der Körper auch unter seinen normalen Bedingungen bevorzugt Alpha-Laktose spalten, so könnte das bedeuten, daß Beta-Laktose infolge ihrer langsameren Spaltung und Resorption als Zucker eine Art Depot-Wirkung bekommt und damit in tiefere Darmabschnitte gelangt, wo die Bifidusflora vorherrscht.

E r g e b n i s s e

1. Wir untersuchten den Einfluß des Duodenal- und Magensaftes auf die Gleichgewichtslage der Laktose und kamen zu dem Ergebnis, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen weder eine Verzögerung noch eine Beschleunigung der Mutarotation festgestellt werden konnte.
2. Es wurde die Gleichgewichtseinstellung der Laktose in Frauenmilchfiltraten untersucht. Da dabei keine Drehungsänderung festgestellt werden konnte und auch Versuche zum Nachweis einer Bindung an Proteine und damit einer Stabilisierung einer der beiden Laktose-Formen keine verwertbaren Ergebnisse brachten, kamen wir zu der Vermutung, daß sich die beiden Laktose-Komponenten beim Verlassen der Mutterbrust bereits im Gleichgewicht befinden.
3. Ferner wurde die Einwirkung des Enzyms Laktase auf die beiden Laktose-Formen geprüft. Es wurden zwei Versuchsreihen angesetzt, einmal bei Körpertemperatur, ein zweites Mal bei 0° C. Bei Körpertemperatur konnten wir feststellen, daß nach Einstellung des Gleichgewichts gleich viel Alpha- und Beta-Laktose durch Kalbslaktase gespalten wird. Hingegen konnten wir bei tiefer Temperatur (0° C), bei der die Mutarotation stark verlangsamt und praktisch nur eine der beiden Laktose-Formen vorhanden ist, feststellen, daß die Alpha-Laktose im Vergleich zur Beta-Laktose deutlich bevorzugt aufgespalten wird.

Hiermit ist erstmals ein Unterschied in der enzymatischen Spaltbarkeit von Alpha- und Beta-Laktose sichtbar gemacht worden, wie es bereits M a l y o t h angenommen hatte.

Literaturverzeichnis

- 1) György, P.: Voeding 16 (1955), 347
- 2) Tissier, H.: Recherche sur la flore intestinale des nourissons
Paris 1900
- 3) Bessau, G.: Mschr. Kinderheilk. 68 (1937), 297
- 4) Adam, A.: Mschr. Kinderheilk. 97 (1949), 500
- 5) Malyoth, G.: Klin. Wschr. (1939), 1240 und 1270
- 6) Mayer, J.B.: Z. Kinderheilk. 65 (1949), 293
Mschr. Kinderheilk. 97 (1949), 420
- 7) Lust, Pfaundler u. Husler: Krank. d. Kindesalters, Urban & Schwarzenberg, München 1959
- 8) Williamson, M.B.: J. biol. Chem. 156 (1944), 47
- 9) Sittler, P.: Zbl. Bakt. I Orig. 47 (1908), 14 und 145
- 10) Petuely, F.: Biochem. Unters. z. Regulation der Dickdarmflora
des Säuglings. 1957, 5-6
- 11) Gyorgy, P., Kuhn, P., Norris, E.F., Rose, C.S. u. Zilliken, F.:
Diseases Children 84 (1952), 482
- 12) Levesque, J. u. Bastin, R.: La Presse Medicale 1946, 251
- 13) Hirata, Y: Paediatrica Japonica 1 (1958), 67
- 14) Malyoth, G.: Med. Mschr. 1 (1947), 145
- 15) Savelsberg: zit. Stuhlfauth, K.: Pro Infantibus, Alete München 1959, 65
- 16) Paffrath, H.: Mschr. Kinderheilk. 44 (1929), 97
- 17) Sommerfeld, E.: Z. vergl. Physiologie 22 (1935), 414
- 18) Grant, J.: Biochem. 89 (1935), 1905 und 90 (1936), 2027
- 19) Knoch, C.B., Petersen, W.E.: J. Dairy Sci. 28 (1922), 415
- 20) Trener, C.: J. Biochem. 52 (1952), 229
- 21) Kittinger, G.W.: J. Biol. Chem. 205 (1953), 527
- 22) Reithel, F.J., Horowitz, M.G.: J. Biol. Chem. 194 (1952) 839
- 23) Gander, J.E., Petersen, W.E. und Boyer, P.D.: Arch. Biochem. and
Biophys. 60 (1956), 259
- 24) Smith, EEB., Mills, G.T.: Biochem. Biophys. Acta 18 (1955), 152
- 25) Maxwell, E.S., Kalckar, H.M. und Burton, R.M.: Biochem. Biophys.
Acta 18 (1955), 444
- 26) Gander, J.E., Petersen, W.E., Boyer, P.D.: Arch. Biochem. Biophys.
69 (1957), 85
- 27) Wallenfels, K.: Ann. 584 (1953), 63

Ich danke Herrn Professor Dr. K. Stuhlfauth für die Überlassung des Themas und die Hilfe bei der Abfassung der Arbeit. Herrn Fritz H e i n z (Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule München) bin ich für die Beratung der Versuchstechnik und Überlassung der Laboratoriumseinrichtungen dankbar.

Am 23.7.1914 wurde ich in Merzig /Saar als Sohn des damaligen Oberlehrers Ernst F r i t z und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Freiin von Eyss geboren. Ich besuchte in Herne i. Westfalen die kath. Volksschule und anschließend dort die Oberrealschule an der ich Ostern 1933 das Abitur bestand. Nach Ableistung der Arbeitsdienstpflicht begann ich 1934 an der Universität Bonn das Studium der Medizin, das ich durch 2 Jahre Wehrpflicht unterbrechen mußte. 1938-1939 war ich an der Universität Berlin, von dort aus wurde ich zu Kriegsbeginn wieder aus dem Studium herausgezogen. Während des Krieges studierte ich nur 2 Semester an der Universität Münster, so daß ich erst 1949 an der Universität München mein so oft unterbrochenes Studium durch die ärztliche Prüfung abschloß. Ich arbeitete als Assistent an verschiedenen Stellen. Seit 1955 bin ich an der Medizinischen Poliklinik tätig.

